



凝 胶 色 谱 法

汪 大 受

(中国科学院微生物研究所,北京)

概 述

凝胶色谱(凝胶层析)是一种液体柱色谱。利用这种方法,可根据样品中各种物质分子量大小的不同,将样品通过多孔胶床来达到分离的目的。这种方法有许多名称,如凝胶过滤,凝胶渗透色谱,排阻色谱,有限扩散色谱等。目前名称尚未完全统一。

由于凝胶色谱有条件温和、方法简便、操作方便、分离范围广泛、重复性强、回收率高等优点,并能达到比较满意的分离效果,所以对于生物化学物质的分离,特别是象酶等生理活性物质,有其一定的优越性。

凝胶色谱这一方法从60年代初开始应用,现已发展成为生化实验室常用的方法,并且出版了一些专著^[1-5]。

一、原理

凝胶色谱就是被分离的样品按分子量大小先后流出色谱柱。由于凝胶床是由一种溶胀的多孔凝胶组成,当欲分离的物质通过色谱柱时,分子量不同的物质在柱中受到固定相的阻滞作用不同。分子量大的只能沿溶胀凝胶颗粒间的孔隙随溶剂流动而不能渗入凝胶颗粒,故阻滞作用小,流程短,移动速度快而先流出色谱柱;分子量小的则可渗入凝胶颗粒,故阻滞作用大,流程长,移动流速慢而较后流出色谱柱。分离效果常用洗脱曲线表示,所以分离特征直接和洗脱体积有关。

二、应用的限制

由于这种方法是依靠溶液分子的有效移动和扩散,所以样品和洗脱液的粘度都必须很低。有些物质(如芳香类物质)能吸附在凝胶上,从而会引起洗脱的延迟或回收率的降低。

凝胶的物理特性

一、得水值(W_r)

一克干凝胶吸水溶胀时所吸收水的克数叫得水值。这个数值仅仅指凝胶颗粒内部的含水量,不包括柱中颗粒间的存留水。琼脂糖凝胶只有水溶胀状态,不能制成干凝胶,故没有得水值,用它制备凝胶时,用琼脂糖的大约浓度代替得水值。浓度通常用重量百分数表示。得水值和琼脂糖浓度二者均与凝胶实体结构的孔径有关,对同一类型的凝胶来说,水溶胀凝胶中胶实体含量越低,其平均孔径越大。得水值低于7.5称为硬胶,高于7.5称为软胶。所以琼脂糖凝胶无疑是高得水值胶。

二、排阻限度

物质能否渗入凝胶颗粒内部的分子量界限称为排阻限度。孔径的大小可用孔的平均半径表示,但因为样品分子的半径(Stoke半径)通常是未知的,所以这种方法并不实用。因此用排阻限度更为实用些。

三、分段分离范围

凝胶的分段分离范围,即通过此凝胶能够

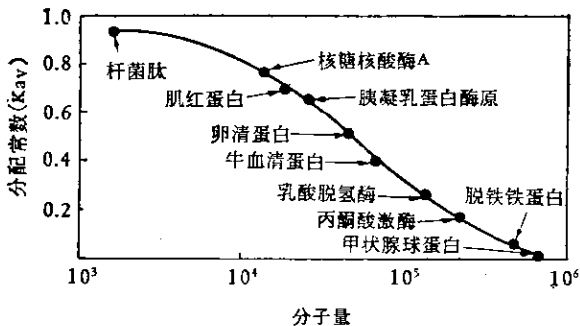


图 1 Sephadex G-200 的选择性曲线

进行分段分离的分子量范围。此范围的上限通常就是排阻限度，下限则不完全确定。分段分离范围可用分子量的对数值与分配系数 (K_{av}) 之间的近似线性关系表示 (图 1)。一般分子量在此线性关系范围内的物质均可进行分段分离。

四、颗粒的形状与大小

最理想的凝胶颗粒应是球形，因为它能使柱装得均匀，流速最快。球形的琼脂糖凝胶能产生最好的分辨力。颗粒愈细分辨力愈强，因为愈细则单位体积内凝胶颗粒的表面积愈大。颗粒细度为 100—10 微米时，其每立方厘米中颗粒表面积的总和为 10—100 米²。但颗粒愈细流速也愈低。某些用得较多的凝胶 (葡聚糖凝胶，聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶等)，由于其机械性能限制而不能无限加大操作压力以加大流速，所以在多数情况下要兼顾分辨力和流速。最近一些国外产品如 Sephacryl S-200 等，颗粒很细又有承受足够压力的机械性能，流速就不再是问题了。通常实验室多用 50—300 微米直径 (水溶胀后的直径) 的颗粒。颗粒大小的选择要看具体应用。例如用于脱盐，虽不要求很高的分辨力，但要求较高的流速，所以选择较大的颗粒。又如薄层凝胶色谱，要求尽可能高的分辨力，所以应选择直径小于 50 微米的颗粒。图 2 是说明流速和颗粒大小对分辨力影响的一个实验。

表 1—3 是三种常用凝胶的物理特性。

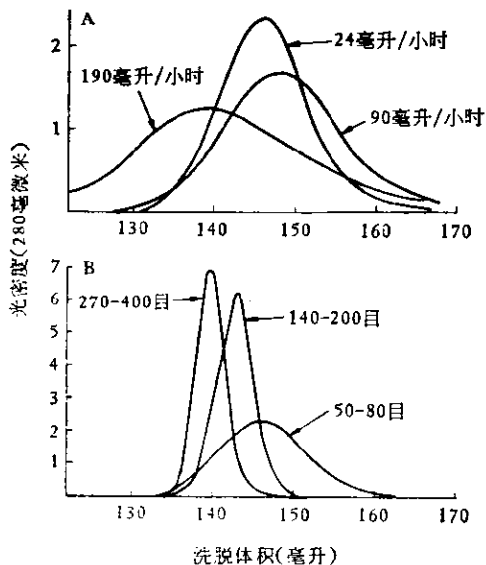


图 2 尿酸用 Sephadex G-25 色谱柱 (2×65 厘米) 分离时，流速和颗粒大小对分辨力的影响。

A: 颗粒大小为 50—80 目，用 3 种流速。

B: 流速为 24 毫升/小时，用 3 种不同大小的颗粒。

凝胶的化学特性

一、葡聚糖凝胶 (Sephadex)

这种凝胶的原料是线性葡聚糖 (α -1,6 吡喃型葡聚糖)，将这种多糖纯化后与环氧氯丙烷反应，把丙三醇链导入葡萄糖链间形成交联链。这种交联体在水中能溶胀，但不溶解。调节葡聚糖的分子量和参加反应的环氧氯丙烷的配比，就能控制交联程度从而控制其平均孔径。目前市售的葡聚糖凝胶共 8 种，其型号根据得水值 $\times 10$ 得来，如 G-10 的得水值为 1，G-200 的得水值为 20 (见表 1)。

葡聚糖凝胶的化学稳定性很强，一般不与生化试剂发生反应，也不与有机溶剂、弱碱、弱酸和浓的尿素或盐酸胍溶液作用。用很浓的洗脱液或很高很低的 pH 值可改变其得水值和排阻限度。当 pH 值低于 2 时，糖苷键断裂，pH 值高于 12 时，多糖发生碱降解。提高温度可加速这两个过程。但如果暴露时间短，也可在很高或很低的 pH 值下使用葡聚糖凝胶。

芳香类和杂环类化合物或环状糊精可吸附在凝胶颗粒上，而硼酸盐离子与葡聚糖能形成

表 1 葡聚糖凝胶(Sephadex)的物理特性

型 号	干胶颗粒直径(微米)	得 水 值	床体积(毫升/克)	最适分段分离范围(分子量)		溶胀所需时间(小时)		最大流体静力压(厘米水柱)	
				球 蛋 白	线形葡聚糖	20°	100°		
G-10	40—120	1.0±0.1	2—3	700	700	3	1	>100	
G-15	40—120	1.5±0.2	2.5—3.5	1500	1500	3	1	>100	
G-25	粗	100—300	2.5±0.2	4—6	1000—5000	100—5000	5	2	>100
	中粗	50—150							
	细	20—80							
	超细	10—40							
G-50	粗	100—300	5.0±0.3	9—11	1500—30000	500—10000	6	2	>100
	中粗	50—150							
	细	20—80							
	超细	10—40							
G-75		40—120	7.5±0.5	12—15	3000—70000	1000—50000	24	3	50
	超细	10—40							
G-100		40—120	10±1.0	15—20	4000—150000	1000—100000	48	5	35
	超细	10—40							
G-150		40—120	15±1.5	20—30	5000—400000	1000—150000	72	5	15
	超细	10—40							
G-200		40—120	20±2.0	30—40	5000—800000	1000—200000	72	5	10
	超细	10—40							

复合体,因而会改变凝胶的色谱性质。

所有的葡聚糖凝胶每克干重均含10—20微克分子的羧基。所以洗脱的离子强度应 ≥ 0.02 ,以防带电溶质与这些羧基离子相互作用产生干扰,使溶质通过层析柱的速度减慢或加快。含有氧化剂的洗脱液能增加羧基的含量,故应避免使用。

从葡聚糖凝胶柱流出的洗脱液中,可能有少量游离的葡聚糖,对于高得水值凝胶来说,尤为明显。所以多糖的色谱最好用聚丙烯酰胺凝胶。如果样品中含有葡聚糖杂质,则应绝对避免采用葡聚糖凝胶。

二、聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Gel P)

这种凝胶由丙烯酰胺($H_2C=CHCONH_2$)和交联剂次甲基双丙烯酰胺($H_2C=CHCONH$

$CH_2NHCOCH=CH_2$)共聚形成的,改变单体的浓度就能得到不同得水值的产品。市售的该种凝胶共 10 种(表 2)。其型号根据大致的排阻限度($\times 10^3$)而定。如 P-2 的排阻限度为 2000。

这种凝胶不溶于水和一般有机溶剂,也不和浓的盐、尿素或盐酸胍溶液反应。它在 pH1—10 范围内均稳定。如果超出此范围,短时间仍稳定,但应避免长期处于强酸和强碱条件下。在高温时能使酰胺基大量水解,从而产生羧基,增加了离子交换能力,每克干凝胶含 0.05 微克分子以下的羧基,如果酰胺基水解则引起羧基的增加,从而增加了凝胶的离子交换能力。酸性或碱性很强的物质,以及芳香类化合物均能被吸附,特别是在洗脱液离子强度很低的情况下。但大多数情况下这种吸附作用没有葡聚糖凝胶明显。

表 2 聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Gel)的物理特性

型 号	湿颗粒大小 (筛目)	得水值 (±10%)	床体积 (毫升/克)	对球蛋白的最适 分段分离范围	水溶胀时间(小时)		最大流体静力 压(厘米水柱)
					20°	100°	
P-2	50—100 100—200 200—400 400	1.5	3.0	200—1,800	4	2	>100
P-4	50—100 100—200 200—400 400	2.4	4.8	800—4,000	4	2	>100
P-6	50—100 100—200 200—400 400	3.7	7.4	1,000—6,000	4	2	>100
P-10	50—100 100—200 200—400 400	4.5	9.0	1,500—20,000	4	2	>100
P-30	50—100 100—200 400	5.7	11.4	2,500—40,000	12	3	>100
P-60	50—100 100—200 400	7.2	14.4	3,000—60,000	12	3	>100
P-100	50—100 100—200 400	7.5	15.0	5,000—100,000	24	5	50
P-150	50—100 100—200 400	9.2	18.4	15,000—150,000	24	5	35
P-200	50—100 100—200 400	14.7	29.4	30,000—200,000	48	5	25
P-300	50—100 100—200 400	18.0	36.0	60,000—400,000	48	5	15

三、琼脂糖凝胶(Sephrose, Bio-Gel A)

琼脂糖主要是琼脂中的线性多聚糖，主要由 D-半乳糖和 3,6-脱水 L-半乳糖残基组成。决定这种凝胶质量好坏的关键因素，是制备过程中离子基团除去得如何。如带负电荷的琼脂胶 (agaropectin)，应尽量除去其负离子。该种凝胶形成的结合力的性质尚不清楚，但至少氢键在其中起了部分作用。

pH 值为 4.0—9.0 时，它是稳定的，较其它凝胶的稳定范围要窄一些。浓的尿素和盐酸胍溶液可减少它的使用寿命。

琼脂糖凝胶的物理刚性要超过同等聚合浓度的聚丙烯酰胺凝胶和葡聚糖凝胶，因此相应能得到较高的洗脱流速。

它的分段分离范围与前述两种凝胶是部分重叠的。而在重叠范围内，葡聚糖凝胶的分辨力比琼脂糖凝胶强。因此，除非要求较高流速，应尽可能用葡聚糖凝胶。干燥能破坏琼脂糖凝胶颗粒，因此市售的商品都是水溶胀的。长时间和剧烈的搅拌亦能使它破坏。冷冻对它也有不良影响。加热超过 40℃ 能引起它的溶解。

最近，Pharmacia Fine Chemicals 公司又生产了一种交联琼脂糖凝胶，其型号有 Sepharose

表 3 琼脂糖凝胶的物理特性

型 号*	琼脂糖含量 (大约%)	湿颗粒大小	最适分段分离范围(分子量)		最大流体静水压 (厘米水柱)
			球蛋白和病毒	线性葡聚糖	
Bio-Gel A-0.5M	10	50—100(筛目) 100—200(筛目) 200—400(筛目)	<10 ⁴ —5×10 ⁵		>50
Bio-Gel A-1.5M	8	同 上	<10 ⁴ —1.5×10 ⁶		>50
Bio-Gel A-5M	6	同 上	10 ⁴ —5×10 ⁶		50
Bio-Gel A-15M	4	同 上	4×10 ⁴ —1.5×10 ⁷		40
Bio-Gel A-50M	2	50—100(筛目) 100—200(筛目)	10 ⁴ —5×10 ⁷		20
Bio-Gel A-150M	1	同 上	10 ⁴ —1.5×10 ⁸		10
Sepharose 6B	6	40—120微米	10 ⁴ —4×10 ⁶	10 ⁴ —10 ⁶	50
Sepharose 4B	4	40—190微米	10 ⁴ —2×10 ⁷	10 ⁴ —5×10 ⁶	40
Sepharose 2B	2	60—250微米	10 ⁴ —4×10 ⁷	10 ⁴ —2×10 ⁷	20
Sagovac* 2	2	66—142微米 142—250微米	5×10 ³ —15×10 ⁷		20
Sagovac 4	4		2×10 ³ —15×10 ⁶		40
Sagovac 6	6		5×10 ⁴ —2×10 ⁶		50
Sagovac 8	8		2.5×10 ⁴ —7×10 ⁵		>50
Sagovac 10	10		1×10 ⁴ —2.5×10 ⁵		>50

* Sagovac 是非珠形颗粒,其余均为珠形颗粒

CL-2B, Sepharose CL-4B 和 Sepharose CL-6B。它的特点是稳定,非特异吸收低。可以用浓尿素或盐酸胍溶液,以及有机溶剂进行色谱分析。pH 值在 3 到 12 时均稳定。并可以在 110°—120℃ 高压灭菌。这样就消除了非交联琼脂糖凝胶的一些缺点,应用范围扩大了。此外,LKB 公司生产了一种商品名为 Ultrogel 的产品,它是用聚丙烯酰胺凝胶作成三维空间格子,格子中间填充琼脂糖凝胶。由于有聚丙烯酰胺作架子,因此它比纯琼脂糖凝胶机械性能要好些,它的颗粒较小,分辨力较高。产品共有四种型号,其规格见表 4。

四、其它新产品

近年来,为了寻找更好的凝胶作为凝胶色谱的固定相,对一些高分子化合物作过研究。现举两种市售新产品为例来说明。

一种是美国 Aldrich 公司生产的 Fnyzryl

表 4 Ultrogel 四种型号的规格

型号	聚丙烯酰胺含量(%)	琼脂糖含量(%)	颗粒直径(微米)	有效分段分离范围
AcA22	2	2	均为60—140	10 ³ —1.2×10 ⁶
AcA34	3	4		2×10 ⁴ —3.5×10 ⁵
AcA44	4	4		10 ⁴ —1.3×10 ⁵
AcA54	5	4		5×10 ³ —7×10 ⁴

Gel。它是由 N-丙烯酰胺吗啡碱和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺在水溶液中聚合而成。该产品共有 5 种型号, K₀, K₁, K₂, K₄ 和 K₁₀。型号数字愈大,孔径愈小。它多被用于分离小分子物质,可在水及多种有机溶剂系统中应用,也可以经受加热灭菌,在过高和过低的 pH 值下也稳定,并且不易长菌。

另一种是 Pharmacia Fine Chemicals 公司生产的 Sephacryl S-200。它是一种超细颗粒的新凝胶。可用于分离蛋白质、多糖及其它生物

高分子。它的机械性能和化学性能都很好，用它进行的凝胶色谱，可使用水及有机溶剂，表面活性物质及用于破坏结构的尿素，盐酸胍浓溶液，并可在 120℃ 高压灭菌。它对蛋白质的排阻限度为 ~250000 道尔顿。它虽是超细颗粒，但其标准流速是 30 厘米/小时。

这两种新材料的特点是机械性能更好。因此可以不考虑流体静力压(操作压)，有些材料甚至可以用于高压操作(100psi)^[6]，以便实现快速分离。它们的颗粒最细，应用范围更广。

凝胶色谱中的有关参数

一、定义

(一) 总床体积 (V_t) 凝胶床所占据的体积。

(二) 洗脱体积 (V_e) 对于对称的洗脱峰形，如果样品量很少而可以忽略不计， V_e 就是从加样开始到洗脱峰最高点出现时所需洗脱液体积。如果样品量较大，则 V_e 是从加样开始到洗脱峰开始出现到一半高度时所需洗脱液体积。

(三) 外水体积 (V_0) 也叫空体积，即色谱床中溶胀颗粒之间存留水所占体积。一般用洗脱完全排阻的物质(如平均分子量为 2,000,000 的兰色葡聚糖)所用洗脱液体积表示。此时 V_0 就是 V_e 。通常均匀的硬胶的 V_0 大约等于 0.35 V_t 。

(四) 内体积 (V_i) 被溶胀颗粒内部包埋的液体体积。可用 $V_i = mW$ 表示。 m 是代表干胶的质量。用氧化氙做样品进行色谱时，所测得的 V_e 相当于 $V_0 + V_i$ ，如 V_0 已知，即可求得 V_i 。

(五) 聚合物体积 (V_p) 凝胶本身所占体积，即干凝胶的体积。也可用 V_g 表示。

二、胶床的数理特性

任何一种凝胶柱，均有以下关系式

$$V_t = V_0 + V_i + V_p \quad (1)$$

当每一种溶质通过凝胶柱时，溶质在流动相和固定相之间的分配比例为分配系数 (K_d):

$$K_d = (V_e - V_0)/V_i \quad (2)$$

当溶质分子大到足以被凝胶完全排阻时， $V_e = V_0$ ，此时 $K_d = 0$ 。较小的分子则可进入凝胶内部，此时 $0 < K_d \leq 1$ 。

由于 V_i 值很难精确测定，在了解溶质分配特性时， K_d 不实用。因此把整个凝胶作固定相，分配系数以 K_{av} 表示：

$$\begin{aligned} K_{av} &= (V_e - V_0)/(V_i + V_p) \\ &= (V_e - V_0)/(V_t - V_0) \quad (3) \end{aligned}$$

(3)式中 V_i 、 V_0 和 V_e 都很容易测得。

凝胶对溶质的吸附，能引起 K_{av} 和 K_d 值的增高，而溶质和凝胶颗粒间的离子交换，能使溶质通过柱床的速度减慢或加速，从而使这两个参数增高或降低。 K_d 和 K_{av} 是常数，它与柱的几何形状无关。

凝胶的选择

凝胶色谱分离，可定性分为两大类：组别分离和分段分离。凝胶床直径和长度比以及样品体积的选择，均依进行哪一类分离而定。

一、组别分离

即将样品中不同分子量范围的两大类物质分开。如象蛋白质脱盐或除去核酸制剂中的酚。在这种情况下，选择大分子能被排除 ($K_{av} = 0$)、小分子能渗入 ($K_{av} \approx 1$) 的凝胶最为理想。例如蛋白质脱盐时，所选择的凝胶应考虑能排除混合物中所有的蛋白质，由于大多数蛋白质的分子量均超过 5×10^3 ，所以选择 Sephadex G-25 或 Bio-Gel P6 都是适当的。如果所要分离的蛋白质分子量较高，可选择排阻限度较高的凝胶。如选择 Sephadex G-50 或 Bio-Gel P-30，则分离更为有效。如所要的物质分子量较小，可选择交联度高的凝胶如 Bio-Gel P-2 或 Sephadex G-10 进行脱盐。

用组别分离亦可除去大分子样品中混杂的小分子杂质，如不需要的离子等。

二、分段分离

如果分离样品混合物中各物质之间的分子量差别，比组别分离的物质之间的差别小得多，

则可用分段分离。例如从蛋白质混合物中提纯某种特殊的酶。分段分离时, K_{av} 的差异通常在 0.1—0.2 之间。如已知待提纯物质的大约分子量, 则可根据各种凝胶的分段分离范围 (表 1—3), 选择适当凝胶进行分离。为达到最大分辨力, 应选择有分离效果的最低分段分离范围的凝胶。例如用 Bio-Gel P-300 或 Sephadex G-150, 可用于分离提纯分子量高达 400,000 的蛋白质, 分子量比它更大的物质, 不能进入凝胶而出现在排斥峰中。通常对于球形分子而言, 凝胶色谱的分段分离范围一直可达 0.5 亿。

如果不知道待分离物质的分子量, 则应根据推测的分子量先做预备试验, 仔细地分析实验中的洗脱曲线, 以便调整和改进行正式实验。

凝胶色谱设备的选择

一、色谱柱

凝胶色谱设备中重要的是色谱柱。一个好的色谱柱应具有下列特点:

1. 用坚固的塑料或玻璃制成, 因为金属易受腐蚀和干扰样品的生物活性。

2. 床底应不易粘连, 不吸附溶质, 而且不使凝胶通过。最好的作床底的材料是细孔 (400 目) 的尼龙或聚四氟乙烯纱。泡沫塑料易粘连而使洗脱速度减慢或流速不匀。烧结玻璃或玻璃棉也有同样的缺点, 而且它还易于吸附溶质, 死体积也太大。图 3 是一种简易的色谱柱床底示意图。用这种装置, 可以保证柱床的通畅 (没有死角), 也可以控制死体积到最小。

3. 柱床的死体积应尽量小, 一般最好小于总体积的千分之一。死体积大会影响分辨力, 并使洗脱下来的分离物浓度被稀释。

4. 出液口要用细口径管, 一般内径为 1 毫米。如果管径太大, 则死体积增大, 聚四氟乙烯或聚乙烯管最稳定, 但不易装牢。聚氯乙烯管虽较易安装, 但它会释放某些紫外光吸收物质, 造成干扰。

5. 进行上行色谱分析时, 有必要装上插入

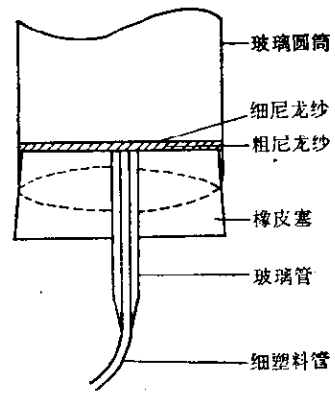


图 3 一种自制的简易柱床底

或流动接应器, 其它色谱必要时也可采用。流动接应器也便于自动加样和循环分析。

6. 柱床外围可做一个水夹套, 以利于保温。

二、色谱柱直径

直径太小易使分离不完全, 太大则分离样品浓度太稀。确定某特定样品分离时应采用的最适柱直径, 可先进行预备试验。选择柱直径, 没有一定规律可循。但用于脱盐时, 柱长与直径比应为 5:1 到 15:1, 进行分段分离时, 应为 20:1 到 100:1。

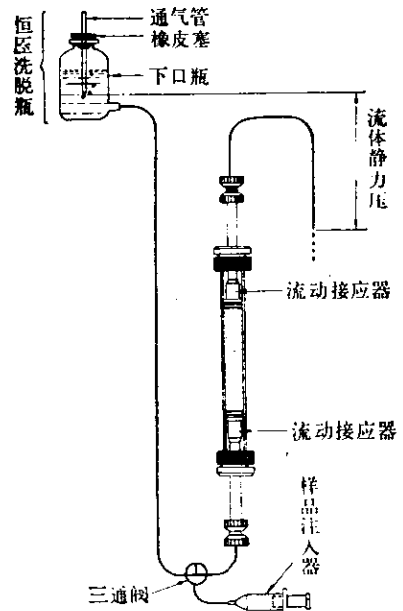


图 4 上行色谱的洗脱装置

三、色谱柱长度

增加有效柱长可增加分辨力。如果以 L 代表柱长,则分辨力随 \sqrt{L} 的增加而增加,但柱长增加一倍,分辨力增加 40%,同时流速降低 50%。实验室很少用超过 1 米长的色谱柱,这主要是由于凝胶过长时易变形。如果柱长需要超过 1 米,则可将几个短柱借助流动接应器连接。循环(recycling)技术也可增加有效柱长。如果样品中所含物质种类较少且 K_{av} 值很接近,可用循环技术。这种技术操作困难,但有只需一根柱即可进行工作的优点。其主要设备有洗脱泵、紫外光监测仪、流动接应器和四通阀。

图 4 是一种上行色谱的洗脱装置,如出液口高于凝胶床上表面,则凝胶床内液体不会流干。

洗脱与凝胶溶胀

一、洗脱

由于凝胶色谱的材料不受大多数缓冲液离子影响,因而凡对分离样品稳定的离子都可选来配缓冲液。不同离子的缓冲液洗脱曲线可能不相同,这通常是由于样品中发生的变化不同造成的。某些有机溶剂和高浓度的盐类、尿素或盐酸胍能使凝胶颗粒收缩或胀大,从而引起排阻限度改变。

所有凝胶色谱的基质均含少量可电离的基团,为了减少它们和样品的带电基团间的相互作用,洗脱液离子强度应 ≥ 0.02 。

当不希望缓冲液的离子混入被分离物中时,可考虑采用挥发性缓冲液。如甲酸、碳酸和醋酸的铵盐,以及吡啶、乙二胺和氨基乙醇等,这些物质在事后用冷冻干燥法很易除去。

为了防止凝胶床内形成气泡,最好用煮沸或抽气的方法除去缓冲液中溶解的气体。洗脱液的温度也应与柱床的温度一致。

二、葡聚糖和聚丙烯酰胺溶胀凝胶的制备

这两种凝胶均可用干凝胶加过量洗脱液溶胀。可轻轻搅拌打散聚结的团块。一般床体积

约为得水值的 1 倍。任何情况下不能剧烈搅拌凝胶,以免凝胶颗粒结构的破坏。特别是软凝胶较脆弱,更易破坏。这两种凝胶都能在室温或沸水浴中用水溶胀。

用水溶胀后的凝胶,如果有过细的颗粒存在,可用浮选法除去,但凝胶在反复浮选过程中有少量丢失。

溶胀胶中的气体应除去,可用除去洗脱液中气体的方法。如须保存,则要注意防腐。

三、琼脂糖溶胀凝胶的制备

琼脂糖凝胶商品已是溶胀了的,所以只须浮选除去其中过细颗粒即可。由于它在 40°C 即开始溶解,除气体时应避免用煮沸的方法,最好在除气体时将其适当稀释。

装柱

装柱的方法依凝胶的得水值而定。

一、低得水值凝胶($W_v < 7.5$)的装柱步骤

1. 除去气体的溶胀凝胶应与柱色谱的操作温度一致。装柱时也应尽量一致,因为水的收缩和膨胀能使装柱不均匀。

2. 凝胶浆的稀稠应利用灌注,适当稀释利于排除装柱过程中产生的气泡。装柱前应将溶胀凝胶用洗脱液稀释好。

3. 柱要固定在牢固的支架上,并应垂直。

4. 底部的插入式流动接应器应尽量缩回一些,以便调节。

5. 柱内应用洗脱液充满,检查是否漏水。出水口应打开以排除里面的气泡,然后关闭出水口使柱中洗脱液体积约占总体积的 15%。

6. 如有必要,应在柱的顶端接上凝胶浆贮存器。

7. 徐徐灌入凝胶浆,注意避免产生气泡。

8. 装完柱后,停 10 分钟,打开出水口排出过量洗脱液。

9. 当洗脱液表面在凝胶上表面 2—5 厘米时关闭出水口。如需继续装柱,应将凝胶面均匀搅拌,然后再继续装柱。则否由于大小颗粒

沉降快慢,会形成可见接缝。

10. 如有必要,柱的上端可装一个流动接应器。安装时凝胶表面应保留 2—3 厘米高度的洗脱液,同时注意避免产生气泡。

11. 将恒压洗脱瓶与柱入口相联。开始时流速不断下降。下行色谱时至少需 2 倍柱体积的缓冲液通过柱后,才能使流速稳定下来。如需进行上行色谱,可在流速稳定后改为上行。此时要调节上部的流动接应器的位置,使之和凝胶床接触。

12. 通过调节恒压洗脱瓶的高低位置调节流速。硬凝胶较坚实,可用较高的操作压力来提高流速。

13. 装柱完毕,应进行检查(详见下述)。

二、高得水值凝胶($W_r \geq 7.5$)的装柱步骤

软凝胶的机械性能较差,易受压变形。因此装柱和洗脱时应尽可能避免过分压实。装柱和洗脱时均不要超过规定的流体静力压值(见表 1—3,该值代表不能超过的最大压力)。

1. 按硬凝胶装柱操作步骤 1—7 进行。

2. 装好柱后,放置 20 分钟,注意流出细管的出口与柱中液面间的流体静力压应不超过规定的数值。如超过,则引起流速降低,必须重新装柱。柱的出水口应打开,排出柱上面过多的洗脱液。

3. 如需继续装柱,应关闭出水口。胶床表面亦应均匀搅拌。为了调节适当的流体静力压,出水口管头应放在适当位置。

4. 按“一”中第 10 步进行。

5. 将恒压瓶与柱入水口相联。至少用 3 倍于柱床体积的洗脱液通过,使柱床稳定。下行色谱时,应注意改变柱的出水口管头位置,以防流体静力压超过规定值。如是上行色谱,可在稳定后改为上行,此时应使上部的流动接应器与凝胶床面接触。

6. 如果采用洗脱泵,应使流速不超过床稳定后由重力调节所达到的流速,一般减低 10%。

三、装柱后的质量检查和 V_0 的测定

用一种分子量大到可被凝胶完全排阻的物质(如偶联了兰色染料的葡聚糖 2000)进行凝胶色谱,既可检查装柱质量,也可以同时测定 V_0 。色谱时,可看到有色区带在柱上移动的情况。如果装柱不好,则区带移动不整齐。此大分子色谱时的洗脱体积(V_r)就是色谱柱的空体积(V_0)。

对于葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶,以及浓度在 6% 以上的琼脂糖凝胶来讲,一般由 0.2% 浓度的兰色葡聚糖 2000;对于浓度低于 6% 的琼脂糖凝胶,用 0.5% 的。如果兰色葡聚糖 2000 浓度过高,则由于样品本身的粘度使测定不准确。所需该物质样品的体积和柱直径有关,它的含量只要使兰色区带在柱中通过时看得清就行。该物质在 265 和 630 毫微米处有光吸收峰。配制后的兰色葡聚糖 2000 应放置一昼夜再使用,因为它溶解很慢。它释放出的非偶联染料分子可被凝胶吸附,被吸附的染料可用 5% 的血清蛋白通过柱除去。由于兰色葡聚糖 2000 中含有一部分分子量很大的溶质,所以亦可用于琼脂糖凝胶色谱。用它测定 V_0 时,最先出现的小峰的洗脱体积,即为琼脂糖凝胶床的 V_0 值。

装得好的柱床,可长期使用,但一般不应重复使用一年以上。装好后应避免微生物污染。

样品的制备和加样操作

一、样品的制备

为了防止柱床表面被污染和保证持续的高流速,样品中应完全没有不溶物质。否则可用过滤或高速离心除去。

脂类和脂蛋白易吸附在凝胶上,应事先除去。除去的办法是事先通过一硬凝胶短柱,或用高速离心机或葡聚糖的硫酸酯来沉淀。

如果样品粘度太大,则区带加宽引起分辨力的降低(图 5)。这是由于样品区带的流变学不稳定造成的。另外由于粘度增加,排阻溶质的区带加宽而使分辨力降低。为了避免这种情

况,样品相对于洗脱液的粘度(η_{rel})应不超过 2。样品的相对粘度为 2 时,其粘度近似于浓度为 70 毫克/毫升的血清或蛋白质的粘度。如果样品的粘度过高,而且样品不宜稀释时,则可加入另外的溶质以增加洗脱液本身的粘度,些这溶质常是葡萄糖、蔗糖和葡聚糖。

二、加样操作

加样是液相色谱中关键的步骤。过分稀释或通过凝胶床时不均一会加宽区带从而影响分辨力。

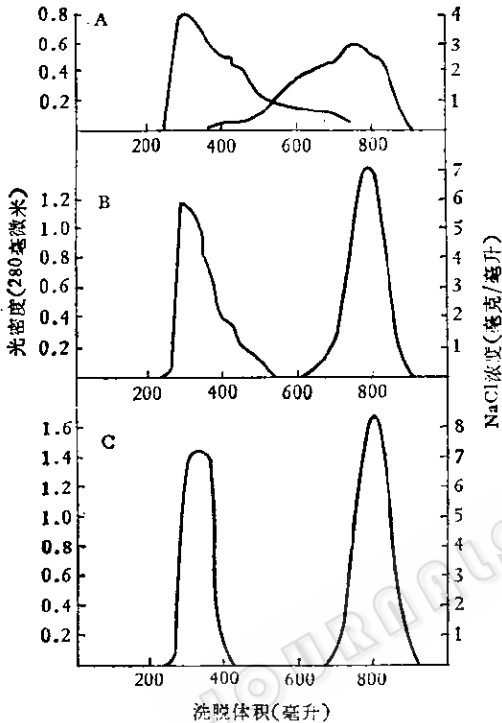
在大多数情况下,样品可直接加到刚看不到洗脱液时的凝胶表面,如洗脱液面超出床面过多,可吸去大部分液体以节省洗脱液流出时间(特别是在流速慢的情况下)。如果柱床表面不平则应搅拌凝胶床表面使其静置变平。然后打开出水口,排出多余的洗脱液,到看不到凝胶床表面有洗脱液时为止。然后关闭出水口不使洗脱液流干。样品可用口径较大的吸管直接加到凝胶表面。加样时要较快,但不要破坏凝胶床平整的表面。为此吸管口应距其表面 1—2 毫米,轻轻滴加样品,并随着样品的加入逐渐提高吸管。加样后,打开出水口,使样品渗入柱内至凝胶表面看不见洗脱液时关闭出水口。再如上述法加入尽可能少的洗脱液。这样加样,样品被稀释得最少。完成上述步骤后,立即在凝胶床表面加入几厘米高的洗脱液,然后将恒压洗脱瓶与人水口相联进行洗脱。为了便于加样,可在软凝胶床上面加一层硬凝胶,如 Sephadex G-10 或 Bio-Gel P-2。最好不用玻璃棉或滤纸保护胶床表面,因为它们会吸附溶质并降低洗脱液流速,或使洗脱流速不一致。

利用插入式流动接应器(图4)加样最方便。这样重复性好、速度快、操作方便。而且上行或下行色谱同样方便。由于接应器直接和凝胶床接触,从而避免了样品的过分稀释。整个操作中应避免产生气泡,如果产生,可用使洗脱液倒流的方法排出。

为熟练加样操作,可用 0.2% 的兰色葡聚糖练习。

洗 脱

洗脱一般借助重力或使用洗脱泵进行。为了保持流速恒定,最好使用恒压洗脱瓶。从洗脱瓶通气管的出口柱床出水口之间的高度,相当于流体静力压。只要通气管的出口一直浸在



A: 样品中加入葡聚糖 2000 使其浓度为 5% ($\eta_{rel}=11.8$)
 B: 样品中葡聚糖 2000 浓度为 2.5% ($\eta_{rel}=4.2$)
 C: 样品中未加葡聚糖

图 5 样品粘度对洗脱的影响

图 5 是在 Sephadex G-25 色谱柱(4×85 厘米,流速为 180 毫升/小时)上将 0.1% 血红蛋白混合物和 1% NaCl 一起进行色谱的结果。

加入样品的体积取决于床体积和分离类型。组别分离时应为床体积的 10—30%,分段分离时最适体积则应为床体积的 1—4% 或 2—5%。当重复试验时,调整加样体积可得到更满意的分离效果。加样太多会使样品溶质洗脱曲线的基线部分重叠,影响分离效果;加样太少则会使分离出的样品过分稀释。

洗脱液中,其流体静力压就是恒定的。对于硬凝胶来说,流速和流体静力压成正比;但是对软凝胶而言,则最大流体静力压不能超过规定的数值,如果超过,则反而使最大流速降低。有时在较大的柱进行洗脱时,为了保持流速恒定,也可采用洗脱泵。

能够获得满意分离效果的最大流速,只能通过试验来决定。一般实验室中,硬凝胶色谱柱的最大流速为2—5厘米/小时,硬凝胶的为10厘米/小时。有人认为分离蛋白质时最适流速应为2厘米/小时。用软凝胶时,洗脱液流速经常受到凝胶床的物理阻力所限制。

降低流速通常能改善分辨力,但如果流速太慢,由于纵向扩散和对流,反而限制了分辨力的提高。

一般最大流速和柱的长度成反比。虽然总的看来,粗柱较细柱的流速大,但单位面积的最大流速和柱直径成反比。这可能是由于直径增加使柱壁对床底支持面的作用减少的缘故。

凝胶床的维护

一、防腐

由于凝胶本身的化学性质,它不易生长微生物,但样品和缓冲液却很容易长菌,特别是它们存留在柱中时更易长菌。因此,凝胶柱暂不使用时,应将柱中的缓冲液内离子(如磷酸根离子)及其它物质冲洗干净。如果要存放凝胶浆,应加防腐剂。常用的防腐剂有0.02%的叠氮

化钠、0.02%三氯丁醇、0.01%硫代水杨酸乙基汞,或0.01%醋酸苯汞。

二、凝胶床吸附了其它物质后的净化

脂类和脂蛋白吸附在柱中,常形成淡黄色区带。如果吸附得很多,能引起流速降低。最简单的除去方法,是用刮勺将它们刮去,再补以等量的溶胀凝胶。如果必要,可用非离子型去污剂,如吐温80(5%的溶液)等。

芳香类化合物很易吸附在凝胶柱上,应立即尽可能除去。如果吸附久了往往难以洗去。这些物质可用缓冲液洗去,在某些情况下延长洗脱时间。也可用有机溶剂,但它们引起凝胶脱水,因此凝胶要重新进行溶胀、装柱。此外,增加缓冲液的离子强度或改变pH,也有助于被吸附物质的解吸。

参 考 文 献

- [1] Fischer, L.: *Laboratory in Biochemistry and Molecular Biology* (ed. Work, T. S. and E. Work), North Holland Publ. Amsterdam, 1969.
- [2] Determann, H.: *Gel Chromatography*, 2nd ed., Springer, New York, 1969.
- [3] Reiland, J.: *Methods in Enzymology*, Vol. 22 (ed. Jakoby, W. B.), 287—321, Academic Press, New York and London, 1971.
- [4] Determann, H.: *Chromatography*, 3rd ed., (ed. Heftmann, E.) 362—392, Van Nostrand-Reinhold, New York, 1975.
- [5] 袁静明: 凝胶层析法及其应用, 科学出版社, 北京, 1975.
- [6] Regnier, F. E.: *J. Chromatog. Sci.*, 14(7): 316—320, 1976.